

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 5/00				
C 1 2 M 1/00	Z			
// C 1 2 N 1/02		8828-4B		
		7729-4B	C 1 2 N 5/ 00	D
審査請求 有 請求項の数14 O L (全 9 頁)				

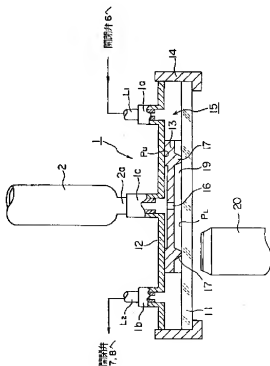
(21)出願番号	特願平6-163869	(71)出願人	000236436 浜松ホトニクス株式会社 静岡県浜松市市野町1126番地の1
(22)出願日	平成6年(1994)7月15日	(71)出願人	591031360 農林水産省食品総合研究所長 茨城県つくば市観音台2丁目1-2
		(72)発明者	菊池 佑二 茨城県つくば市観音台2-1-2 農林水 産省食品総合研究所内
		(72)発明者	宮本 末雄 静岡県浜松市市野町1126番地の1 浜松ホ トニクス株式会社内
		(74)代理人	弁理士 長谷川 芳樹 (外3名) 最終頁に続く

(54)【発明の名称】 細胞分画方法及び細胞分画装置

(57)【要約】

【目的】 多量の細胞を自動的且つ高精度で分画処理することのできる細胞分画方法及び細胞分画装置を提供することを目的とする。

【構成】 分画処理すべき細胞が流入側から流出側へ通過し得る形状の多数の微細通路を半導体微細加工技術により半導体基板に形成し、このように形成された半導体基板から成るフィルタ部材(13)の流入側(1c)(16)に、細胞を含む浮遊細胞液を供給すると共に、流入側(1c)(16)に対して流出側(15)を負圧にして、微細通路(17)を介して流入側から流出側へ通過した細胞を回収するようにした。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 分画処理すべき細胞が流入側から流出側へ通過し得る形状の多数の微細通路が半導体微細加工技術により半導体基板上に形成して成るフィルタ部材の前記流入側に、前記細胞を含む浮遊細胞液を供給すると共に、前記流入側に対して前記流出側を負圧にし、前記微細通路を介して流入側から流出側へ通過した細胞を回収することを特徴とする細胞分画方法。

【請求項2】 前記微細通路の形状は、前記分画処理すべき細胞の硬さ、形状、変形能、活性の少なくとも1つの特性に基づいて形成することを特徴とする請求項1に記載の細胞分画方法。

【請求項3】 前記分画処理すべき細胞は、プロトプラストであることを特徴とする請求項1に記載の細胞分画方法。

【請求項4】 前記分画処理すべき細胞は、血球であることを特徴とする請求項1に記載の細胞分画方法。

【請求項5】 分画処理すべき細胞が流入側から流出側へ通過し得る形状の多数の微細通路が半導体微細加工技術により半導体基板上に形成されて成るフィルタ部材と、前記細胞を含む浮遊細胞液を前記フィルタ部材の流入側へ供給する供給手段と、前記流入側に対して前記流出側を負圧にすることにより、前記細胞を前記微細通路を介して流入側から流出側へ通過させる差圧発生手段と、を備えることを特徴とする細胞分画装置。

【請求項6】 分画処理すべき細胞が流入側から流出側へ通過し得る形状の多数の微細通路が半導体微細加工技術により半導体基板上に形成されて成るフィルタ部材を仕切りとして密封収容することにより、前記流入側の処理室と前記流出側の処理室とを有する細胞分画ユニットと、

前記細胞を含む浮遊細胞液を前記細胞分画ユニットの前記流入側の処理室へ供給する供給手段と、前記流出側の処理室を負圧吸引にすることにより、前記流入側の処理室中の細胞を前記微細通路を介して流出側の処理室へ通過させる差圧発生手段と、を備えることを特徴とする細胞分画装置。

【請求項7】 前記流出側の処理室の内圧と前記流出側の処理室の内圧との差圧を正負交互に変化させる圧力を、前記流出側の処理室へ供給する差圧調整手段を設けたことを特徴とする請求項6に記載の細胞分画装置。

【請求項8】 前記流出側の処理室の内圧と前記流出側の処理室の内圧との差圧を正負交互に変化させる圧力を、前記流入側の処理室へ供給する差圧調整手段を設けたことを特徴とする請求項7に記載の細胞分画装置。

【請求項9】 前記流出側の処理室の内圧と前記流出側の処理室の内圧との差圧を正負交互に変化させる圧力を、前記流入側及び前記流出側の処理室へ供給する差圧調整手段を設けたことを特徴とする請求項7に記載の細胞分画装置。

【請求項10】 差圧調整手段は、前記差圧を正負異なる大きさに変化させる前記圧力を、前記処理室へ供給することを特徴とする請求項7ないし請求項9のいずれか1項に記載の細胞分画装置。

【請求項11】 差圧調整手段は、前記差圧を正負異なる時間周期で変化させる前記圧力及び、前記処理室へ供給することを特徴とする請求項7ないし請求項9のいずれか1項に記載の細胞分画装置。

【請求項12】 差圧調整手段は、前記差圧を逐次検出する圧力センサを有し、該圧力センサの計測値に基づいて前記圧力を所定条件に設定する帰還制御手段を備えることを特徴とする請求項7ないし請求項11のいずれか1項に記載の細胞分画装置。

【請求項13】 前記細胞分画ユニットには、前記フィルタ部材を透過観測可能な光透過部が設けられ、該光透過部を介して細胞分画ユニット内部を撮影する撮影手段が設けられていることを特徴とする請求項6に記載の細胞分画装置。

【請求項14】 前記フィルタ部材の前記微細通路の形状は、前記分画処理すべき細胞の硬さ、形状、変形能、活性の少なくとも1つの特性に基づいて形成されることを特徴とする請求項5又は請求項6のいずれか1項に記載の細胞分画装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、微細な個々の細胞を自動的に分画処理する細胞分画方法及び細胞分画装置に関する。

【0002】

【従来の技術】従来、バイオテクノロジー分野において、プロトプラスト培養やプロトプラスト融合等を行うために個々のプロトプラストを単離したり、医療分野や医学分野等において、血球成分を赤血球と白血球及び血小板の夫々に分離するような場合に、図*に示すように、研究者等が顕微鏡下で確認しながら、マイクロマニピレータやマイクロピペット等を操作して個々の細胞を分離・抽出していた。しかし、かかる手作業による分画処理は、熟練と多大な労力とを必要とする割には非効率的であり、多量の細胞を短時間で処理することができない問題があった。又、分画処理中に細胞を破壊してしまい、有効な細胞を入手することが困難となる問題があった。

【0003】そこで、浮遊液中の細胞を個々に分光測定して、細胞集団の性質を分析するフローサイトメトリ法を適用したフローサイトメータ（例えば、日本分光工業株式会社製「型番：Cyto ACE-150」）や、細胞培地の表面に付着した細胞を蛍光分析や形態分析して自動分画するレーザーサイトメータ（例えば、株式会社日科機製「型番：ACAS 570」）等が開発されるようになった。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、上記のフローサイトメータとレーザサイトメータのようにフローサイトメトリ法を適用した従来装置においては、細胞の蛍光的・形態的な観点での分画処理を行うことができるが、細胞膜の硬さや細胞の変形能等の機能的な側面での分画処理を行うことができなかった。更に、フローサイトメータは、光学的に細胞を分画するので、その細胞の位置や向きが変化することによって、その細胞が焦点面からずり易く、高精度の分画処理を実現することが困難であった。一方、レーザサイトメータは、大量の試料細胞を分画するのに適さないという問題があった。

【0005】本発明はこのような課題に鑑みて成されたものであり、多量の細胞を自動的に且つ高精度で分画処理することのできる細胞分画方法及び細胞分画装置を提供することを目的とする。

【0006】

【課題を解決するための手段】このような目的を達成するために本発明は、分画処理すべき細胞が流入側から流出側へ通過し得る形状の多数の微細通路を半導体微細加工技術により半導体基板に形成し、このように形成された半導体基板から成るフィルタ部材の前記流入側に、前記細胞を含む浮遊細胞液を供給し、更に、前記流入側に対して前記流出側に負圧にして、前記微細通路を介して流入側から流出側へ通過した細胞を回収するようにした。

【0007】又、前記流出側と前記流出側との差圧を正負交互に変化させる圧力を、前記流出側の処理室へ供給することにより、フィルタ部材の微細通路の流れ方向を交互に変化させるようにした。

【0008】

【作用】このような細胞分画方法及び装置によれば、浮遊細胞液の中の所望の細胞だけがフィルタ部材の前記多数の微細通路を通過して流出側に出力し、残余の細胞等の物質が微細通路を通過しないで流入側に残留することとなり、流出側に出力した細胞を回収することによって、多量の細胞を迅速且つ容易に分画処理することができる。

【0009】又、前記流出側と前記流出側との差圧を正負交互に変化させる圧力を、前記流出側の処理室へ供給すると、微細通路に付着する細胞を離脱せたり、予め細胞の付着を防止することができ、円滑な細胞分画を達成することができる。

【0010】そして、微細通路の形状を、前記分画処理すべき細胞の硬さ、形状、変形能、活性の少なくとも1つの特性に基づいて形成することによって、様々な態様が可能となる。例えば、プロトプラストや血球等の分画処理に多大な効果を発揮する。

【0011】

【実施例】以下、本発明による細胞分画装置の一実施例

を図面と共に説明する。まず、図1に基づいて実施例の装置構成を説明する。本発明の要部エレメントである細胞分画ユニット1と、細胞浮遊液（即ち、分画処理されるべき細胞を生体食塩水などの溶液中に混合させたもの）を収容するためのマイクロシリンジ2と、細胞を流動搬送するための生理食塩水等の液を収容するためのタンク3と、分画処理中に不要となった溶液を回収するための洗浄用タンク4と、細胞浮遊液及び流動搬送液の流れと流れ方向を制御するための負圧タンク5と、夫々の構成エレメント間を連結する連結管 L_1 、 L_2 の一端側に設けられた第1ないし第4の開閉弁6、7、8、9が備えられ、負圧タンク5と第2の開閉弁7とを連結する連結管の途中に、分画処理された細胞を回収するための回収容器10を介在させるようになっている。

【0012】即ち、タンク3と細胞分画ユニット1の第1の連結口1aとが連結管 L_1 によって連結され、連結管 L_1 の途中に設けられている第1の開閉弁6により流路を開閉制御するようになっている。又、細胞分画ユニット1の第2の連結口1bに連結される連結管 L_2 の一方の分枝管が、第2の開閉弁7を介して回収容器10に連結され更に回収容器10と負圧タンク5を連結し、第2の開閉弁7によりその流路を開閉制御する。更に、連結管 L_1 の他方の分枝管が、第3の開閉弁8を介して洗浄用タンク4に連結され、第3の開閉弁8によりその流路を開閉制御する。更に又、マイクロシリンジ2の上側連結口と洗浄用タンク4とが、連結管 L_3 によって連結され、連結管 L_3 の途中に設けられている第4の開閉弁9によってその流路を開閉制御するようになっている。そして、これらの開閉弁6～9は、電磁弁等が適用されることにより、後述する中央制御ユニット23中のマイクロコンピュータ等によって電氣的に開閉制御される。

【0013】更に、図1において、洗浄用タンク4には、当該タンク4内を吸引することによって負圧にする第1のポンプ4aと、内部圧力を計測する圧力センサ4bが設けられ、負圧タンク5には、当該タンク5内を吸引することによって負圧にする第2のポンプ5aと、内部圧力を計測する圧力センサ5bが設けられている。そして、第2、第3、第4の開閉弁7、8、9を個々に開閉制御することによって、各連結管 L_1 、 L_2 内の圧力を制御するようになっている。

【0014】更に、各構成エレメントの構造を詳述する。細胞分画ユニット1は、図2の要部縦断面図に示すように、下側平板部材11と、この下側平板部材11に対向配置される上側平板部材12と、下側平板部材11と上側平板部材12の内側面に挟着されるフィルタ部材13と、これらの下側平板部材11と上側平板部材12の側端周囲を完全に密着・封止する側端部材14で構成されている。尚、この実施例では、各部材11～13は、周知の嵌着部品などを用いて図示の如く一体的に組

合わされた状態で細胞の分画処理に使用されるが、分画処理の前後において上記の嵌着部品を取り外すことにより、個々に分解することができるようになっている。このように、かかる細胞分画ユニット1は分割可能となっている。但し、使用の態様に応じて、この細胞分画ユニット1は、予め嵌着材等によってこれらの部材11〜13を一体的に固着して成る分解不可の構造にしてもよい。

【0015】下側平板部材11は、透明ガラスや透明プラスチックなどの透光性を有する硬質材料によって成型され、フィルタ部材13に接触する内側面P、が極めて滑らかに平面研磨されている。

【0016】上側平板部材12は、下側平板部材11との対向形状が同一（例えば、円形や矩形）成型されると共に、ガラスやプラスチックなどの硬質材料によって成型され、フィルタ部材13に接触する内側面P、が極めて滑らかに平面研磨されている。そして、これら上側平板部材12と下側平板部材11との側壁が筒状（例えば、これらの部材11、12に合致する円筒状や矩形筒状）の側端部材14内に嵌め合わされて密封される。更に、上側平板部材12の上部側端には、連結管L₁、の先端を密着して連結するための上記連結口1aと、連結管L₂、の先端を密着して連結するための上記連結口1bと、マイクロシリンジ2の下端口2aを密着して連結するための連結口1cが一体に成型されている。ここで、これらの連結口1a、1b、1cと連結管L₁、L₂及びマイクロシリンジ2の下端口2aとは着脱可能となっており、操作者が、分画処理に際してこれらを手作業にて連結するようになっている。したがって、分画処理対象である細胞の種類に応じて、種類の異なる細胞分画ユニット1を選択的に使用することができるようになっている。

【0017】フィルタ部材13は、半導体デバスを製造するために用いられる所謂シリコンウエハなどのシリコン平板で形成され且つ、下側平板部材11と上側平板部材12及び側端部材14によって囲成されて成る処理室15内の略中央に收容可能な大きさ形成されている。更にフィルタ部材13の構造を図3〜図5に基づいて詳述する。図3は下側平板部材11の内側面に密着される下側端の形状を、図4は上側平板部材12の内側面に密着される上側端の形状を示す。フィルタ部材13の略中央部分の上側端から下側端に貫通して、試料細胞の直径に較べて極めて大きな内径（数mm〜数cm）の貫通孔16が穿設され、更に図3に示すように、下側端には、この貫通孔16の周囲を囲む一定高さ且つ厚さの塀状の突条部17が形成され、この突条部17によって仕切られた内側（浮遊細胞液を流入させる側となる）に、貫通孔16と連通する空間を設けるための凹段部（浮遊細胞液を流入させるための処理室の一部となる）18が形成されている。更に図4に示すように、上側端には、貫通

孔16を中心として、比較的浅い凹段部19が形成されている。更に図5に示すように、突条部17の突端部17aには、数μmないし数百μmの幅のいずれかの所定幅W及び深さの凹欠溝17bが形成されている。即ち、夫々の凹欠溝17bが突条部17の厚さ方向に向けて（凹段部18から外側に向けて）切欠き形成され、且つ突端部17aの長手方向に一定ピッチ間隔PH（但し、W<PH）で設けられている。尚、突端部17aの突端面は極めて平坦に研磨されている。

【0018】よって、貫通孔16と上側平板部材12の連結口1cとを相互に対向するようにして、フィルタ部材13が上側平板部材12と下側平板部材11との間に挟着されることにより、多数の凹欠溝17bと下側平板部材11の内側面とで画成されて成る多数の微細流路が構成され、後述するように、供給手段となるマイクロシリンジ2内の細胞浮遊液を貫通孔16を通して流入させると、大きな変形能や変形能等の所定条件を満足する細胞だけがこれらの微細流路を通して、流出側の処理室15へ流出するようになっている。

【0019】尚、凹欠溝17bの形状（即ち、幅Wと溝の深さと形）及びピッチ間隔PHは、分画処理すべき試料細胞の直径やその変形能や硬さ等の形態性、及び上記の微細流路を通過するに際して変形しても損傷や死滅しない許容範囲（活性）等を考慮して恰く設計され、所謂半導体製造技術におけるエッチング技術を適用することによって、このような多数の微細な凹欠溝17bを高精度で一定形状に形成している。又、フィルタ部材13の下側端と下側平板部材11の内側面P、との接触面、及びフィルタ部材13の上側端と上側平板部材12の内側面P、との接触面の夫々にシリコンクリスなどを介在させることにより、分画処理されるべき細胞が貫通孔16と凹欠溝17bのみを通過するように気密性を向上させることが望ましい。

【0020】又、夫々の凹欠溝17bの側壁は、凹段部18側（細胞を流入させる側）が広く、処理室15側（細胞を流入させない側）が狭くなるようなテーパー状の平面に形成してもよいし、更に又、全体としてテーパー状であるがその側壁を若干平坦状もしくは凹状に湾曲したテーパー面にしてもよい。このように側壁をテーパー状にすると、試料細胞の損傷等を低減することができる。更に、凹段部19を形成すると無く、貫通孔16と連結口1cとを略直接的に連通させるようにしてもよい。又、突条部17は、凹段部18側と処理室15側を上述のように略隔絶するものであるが、この実施例に示すように、矩形状の形に限定されるものではなく、例えば環状その他の形状にしてもよい。更に又、この実施例では、突条部17を1個だけ形成したフィルタ部材12を示すがこれに限定されず、貫通孔16を中心に、径の異なる複数の突条部を、分画すべき細胞が流出する方向に同心円状に形成したフィルタ部材であってもよい。

このような複数の突条部を設けると、夫々の突条部の凹欠溝を様々に設計することによって、分画処理の多様性と分画精度の向上などを図ることができる。

【0021】再び図1及び図2に基づいて装置構成を説明すると、細胞分画ユニット1は固定ステージ(図示せず)に固定され、下側平板部材11の外側から処理室15内に拡大視する顕微鏡20と、その顕微鏡20の拡大映像を撮影するビデオカメラ21と、ビデオカメラ21からの出力映像信号を画像処理することによってモニタ22に映像を再生させる中央制御ユニット23と、23と連結管L₁の、一側に連結され中央制御ユニット23の制御によって細胞分画ユニット1内の圧力を調節する差圧調整ユニット24が設けられている。

【0022】ここで、顕微鏡20とビデオカメラ21は、下側平板部材11に対する対向間隔と対向位置を自在に調整するXYZ可動ステージ(図示せず)に取り付けられている。差圧調整ユニット24は、図6に示すように、連結管L₁の管内圧力を検出する圧力センサ24aと、連結管L₁の、一側に設けられた流路切換弁24bを介して連結管L₁に連設されたシリンダ24cと、シリンダ24cのピストン24dの進退移動量をパルスモータ24eの正逆転角によって制御するアクチュエータ24fと、パルスモータ24eへの供給電力の極性を図7の波形図に示す如く変化させることによってその正転と逆転を制御するファンクションジェネレータ24gと、圧力センサ24aの計測値の変化(即ち、連結管L₁内の圧力変化)を調節するためにファンクションジェネレータ24gからパルスモータ24eへの供給電力の極性を自動調整する圧力制御回路24hを備えている。尚、アクチュエータ24fは、パルスモータ24eの駆動軸に連設されたスクリュウと、一端がピストン24dに固着され且つ上記スクリュウに螺合するネジ部とを有し、上記スクリュウの正逆回転に応じてピストン24dを進退移動させるのに伴ってシリンダ24c内の圧力を制御することにより、連結管L₁内の圧力を加減制御する。そして、この差圧調整ユニット24は、分画処理の際に、細胞分画ユニット1内のフィルタ部材13の凹欠溝17bに細胞が目詰まりするのを防止するため等に使用される。

【0023】そして、かかる構成要素と複数の連結管を有する細胞分画装置は、図8に示すような筐体25内に收容されて装置化されている。尚、筐体25には、中央制御ユニット23内のマイクロプロセッサ等に対して種々の動作を指示するための操作キーボード等が設けられている。

【0024】次に、かかる構成の細胞分画装置の動作を説明する。まず、装置の電源をオンにすると、中央制御ユニット23とビデオカメラ21が起動して、顕微鏡20で拡大された細胞分画ユニット1内の映像をモニタ22に再生表示させる。そして、操作者が筐体25に設け

られている操作キーボードを操作して前記XYZステージの位置を適宜に移動させることによって、撮影対象とその拡大率及び焦点位置を最適状態に調節することができ、鮮明な映像をモニタ22に表示させることができる。更に、操作者は、予めタンク3に生理食塩水を入力しておくと共に、回収容器10を第2の開閉弁7と負圧タンク5の間に連結しておき、更に、細胞分画ユニット1の連結口1a、1b、1cに、第1、第2の連結管L₁、L₂とマイクロシリンジ2を連結しておく。又、第3の連結管L₁も予めマイクロシリンジ2の試料注入口に連結しておく。

【0025】次に、操作者が筐体25の操作キーボードにより分画処理の開始を指令すると、中央制御ユニット23の制御により以下の動作が行われる。まず、第1〜第4の開閉弁6、7、8、9の全てが閉鎖状態となる。更に、流路切換弁24bは回収容器10と連結管L₁の間を連通状態にして、差圧調整ユニット24との接続を遮断状態にする。

【0026】次に、第1、第2のポンプ4a、5aを駆動して洗浄用タンク4と負圧タンク5内を所定の負圧状態に設定すると共に、分画処理中は、制御ユニット23が、これらのタンク4、5内の圧力を常に所定の負圧値に保持するように、第1、第2のポンプ4a、5aをオン・オフ制御する。

【0027】次に、第1の開閉弁6と第3の開閉弁8を開放状態にし、洗浄用タンク4の負圧吸引力によって、タンク3内の生理食塩水を、細胞分画ユニット1の処理室15及びこれに連設している連結管L₁、L₂内に流入させ且つ充滿させる。そして、処理室15に生理食塩水が充滿した状態で第3の開閉弁8は閉じられる。この際に余分に吸引した生理食塩水は洗浄用タンク4内に蓄積される。

【0028】次に、第4の開閉弁9を一定時間だけ開放にして、洗浄用タンク4の負圧吸引力によって、タンク3の生理食塩水を細胞分画ユニット1の処理室15を介してマイクロシリンジ2内に一定量注入させる。この際にも、余分に吸引した生理食塩水は洗浄用タンク4内に蓄積される。

【0029】このように、生理食塩水をマイクロシリンジ2と細胞分画ユニット1の処理室15内及び連結管L₁、L₂内に充滿させた後、第1の開閉弁6が閉じられることによって、全ての開閉弁6、7、8、9が一旦閉じられる。

【0030】次に、操作者が、マイクロシリンジ2の上部に設けられている試料注入口から細胞浮遊液を注入することによって生理食塩水と混合させる。尚、マイクロシリンジ2中に気泡が入らないように操作することが望ましい。

【0031】そして、操作者が試料注入の完了を操作キーボードで指令すると、再び、第2の開閉弁7が開放状

態となる。したがって、差圧発生手段となる負圧タンク 5 の負圧吸引力によって、マイクロシリンジ 2 から分画処理ユニット 1 ないし第 2 の連結管 L₁ 及び回収容器 10 による気密流路内に差圧が掛かり（負圧タンク 5 側とは負圧となる）、マイクロシリンジ 2 内の細胞浮遊溶液が生理食塩水と共にフィルタ部材 13 の貫通孔 16 に流入し、更に、凹欠溝 17 b を通過した細胞が第 2 の連結管 L₂ を介して回収容器 10 へ到達して回収・蓄積される。

【0032】ここで、フィルタ部材 13 の凹欠溝 17 b の機能を図 9 及び図 10 と共に説明する。例えば、この実施例の細胞分画装置をプロトプラストの単離に使用する場合を説明すると、そのプロトプラストの直径と、硬さと、変形能などの機能性と、活性及び、分画処理時に設定される負圧条件を考慮した形状の凹欠溝 17 b が形成された突条部 22 を有するフィルタ部材 13 が使用される。そして、上述した分画処理を行うと、図 9 に示すように、所定直径以上の異細胞や細胞壁の除去されていない硬質細胞 P R 1 は、凹欠溝 17 b を通過することができないので、突条部 17 の内側に滞留し、正規の直径及び変形能を有する細胞 P R 2 のみが凹欠溝 17 b を通過して、回収容器 10 に回収される。

【0033】又、この実施例の細胞分画装置を、血球成分から赤血球と白血球と血小板に分離するのに使用する場合には、まず血球成分をマイクロシリンジ 2 に注入してから上述の分画処理を行う。第 1 回目の分画処理においては、赤血球と血小板は通過させるが白血球は通過させない大きさの凹欠溝 17 b を有するフィルタ部材 13 を使用する。この結果、回収容器 10 には赤血球 P R 3 と血小板 P R 4 を有する浮遊細胞液が抽出され、細胞分画ユニット 1 のフィルタ部材 13 の内側に白血球 P R 5 が残存することとなる。そして、この第 1 回目を使用した細胞分画ユニット 1 中のフィルタ部材 13 を別種類のフィルタ部材 13' に取替えて次の第 2 回目の分画処理を行う。この第 2 回目の処理では、血小板は通過させるが赤血球は通過させない形状の凹欠溝 17 b' が形成されている突条部 17' を有するフィルタ部材を使用し、第 1 回目の処理で抽出した赤血球 P R 3 と血小板 P R 4 を有する浮遊細胞液を再びマイクロシリンジ 2 に注入して分画処理を行う。この結果、赤血球 P R 4 は凹欠溝 17 b' を通過せず、血小板 P R 3 のみが回収容器 10 に回収される。

【0034】このように、所定形状の凹欠溝 17 が形成されたフィルタ部材 13 に浮遊細胞液を流すことによって、大きさ、硬さ、変形能等の機能、活性の差に基づいて、所望の細胞を分画処理することができる。又、この実施例の細胞分画装置では、負圧タンク 5 の負圧によって、浮遊細胞液をフィルタ部材 13 に自動的に流すので、大量の細胞を高速に分画処理することができる。

【0035】更に、予め標準となる形状の凹欠溝 17 が

形成されたフィルタ部材 13 を細胞分画ユニット 1 に適用し、マイクロシリンジ 2 に注入した浮遊細胞液について上記同様の分画処理を行うと、負圧タンク 5 に設定されている負圧は常時一定であるので、凹欠溝 17 の内側（貫通孔 16 側）と外側（処理室 15 側）との差圧が、その浮遊細胞液内の細胞固有の大きさ、硬さ、変形能等の機能、活性に応じた圧力となり、更に、マイクロシリンジ 2 中の浮遊細胞液の減少速度がその差圧と相関を有することとなる。よって、マイクロシリンジ 2 中の浮遊細胞液の減少速度を計測することによって、分画処理により抽出した細胞の大きさ、硬さ、変形能等の機能、活性の特性を容易に知ることができるという効果もある。更に、凹欠溝 17 を通過する細胞の移動状態をモニタ 22 に再生表示されている映像によって観察することによっても、細胞の大きさ、硬さ、変形能等の機能、活性の特性を容易に知ることができる。

【0036】次に、差圧調整ユニット 24 の動作を説明する。このユニット 24 は、操作者が必要に応じて選択的に起動させることができるようになっており、例えば、粘性の大きな細胞液を分画処理する場合に、この細胞がフィルタ部材 13 の凹欠溝 17 に目詰まりするのを防止するために動作させたり、目詰まりした凹欠溝 17 から細胞を離脱させて開放状態にすることにより、所望の細胞を通過させ易くするため等に動作させると効果的である。

【0037】即ち、或る細胞を含む浮遊細胞溶液について分画処理する際に、操作者が前記操作キーボードにより動作開始を指令すると、中央制御ユニット 23 の指示により、流路切換え弁 24 b が切替って連結管 L₁ にシリンジ 24 c を連通させ、更に、図 7 に示すような、時間幅 τ_f の正極性と時間幅 τ_r の負極性が周期的に変化する電力がファンクションジェネレータ 24 g からパルスモータ 24 e へ供給され、その電力の極性反転に従ってパルスモータ 24 e が正逆回転するのによってピストン 24 d が進退移動することにより、シリンジ 24 c 内に充填している流動搬送液が連結管 L₁ 内へ往復移動する。したがって、シリンジ 24 c 内の流動搬送液の移動に伴って、フィルタ部材 13 の突条部 17 の内側と外側で正負の差圧が交互に発生して、突条部 17 の凹欠溝 17 b に付着している細胞を離脱させたり、付着を防止することができる。又、上記の時間幅 τ_f と τ_r の比率を変化させたり、 $\tau_f + \tau_r$ の周期を変化させたり、更に正極性と負極性の電力値を変化させて、ピストン 24 d のストローク及び移動速度を変化させることにより、フィルタ部材 13 の突条部 17 の内側と外側で正負の差圧を様々なに変化させることができるので、凹欠溝 17 b に付着している細胞を離脱させたり、その付着を確実に構成することができる。更に又、操作者が操作キーボードにより中央制御ユニット 23 に対してこのような様々な差圧発生条件を指定すると、中央制御ユニット

23が圧力制御回路24eにかかる差圧発生条件を指令し、圧力制御回路24eが圧力センサ24aの計測値に基づいてファンクションジェネレータ24gに差圧発生条件を満足する電力を出力させる掃退制御を行うので、上記の細胞離脱や付着防止を自動的に行うことができる。

【0038】尚、この実施例では、差圧調整ユニット24を、細胞分画ユニット1の下流側に位置する連結管L₁に設けたが、他の変形例として、細胞分画ユニット1の上流側に位置する連結管L₁の一端部(例えば、第1の開閉弁6と連結口1aの間)に設けてもよい。更に又、図6に示すように細胞分画ユニット1の下流側に位置する連結管L₁の一端部と2個の差圧調整ユニット24を設け、夫々の差圧調整ユニット24のピストン24dの進退移動を逆位相で行わせることによって、フィルタ部材13の突条部17の内側と外側で正負の差圧を交互に変化させるようにしてもよい。

【0039】

【発明の効果】以上説明したように本発明によれば、分画処理すべき細胞が流入側から流出側へ通過し得る形状の多数の微細通路を半導体微細加工技術により半導体基板上に形成し、このように形成された半導体基板から成るフィルタ部材の前記流入側に、前記細胞を含む浮遊細胞液を供給し、更に、前記流入側に対して前記流出側を負圧にして、前記微細通路を介して流入側から流出側へ通過した細胞を回収するようにしたので、浮遊細胞液の中の所望の細胞だけがフィルタ部材の前記多数の微細通路を通過して流出側に出力し、残余の細胞等の物質が微細通路を通過しないで流入側に残留することとなり、流出側に出力した細胞を回収することによって、多量の細胞を迅速且つ容易に分画処理することができる。

【0040】又、前記流出側と前記流入側との差圧を正負交互に変化させる圧力を、前記流出側の処理室へ供給することにより、フィルタ部材の微細通路の流れ方向を*

*交互に変化させるようにしたので、微細通路に付着する細胞を離脱させたり、予め細胞の付着を防止することができ、円滑な細胞分画を達成することができる。

【0041】そして、微細通路の形状を、前記分画処理すべき細胞の硬さ、形状、変形能、活性の少なくとも1つの特性に基づいて形成することによって、様々な態様が可能となり、例えば、プロトプラストや血球等の分画処理に多大な効果を発揮する。

【0042】

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明による細胞分画装置の一実施例のシステム構成図である。

【図2】細胞分画ユニットの構造を示す要部縦断面図である。

【図3】フィルタ部材の構造を示す斜視図である。

【図4】フィルタ部材の構造を更に示す斜視図である。

【図5】フィルタ部材に設けられた突条部及び凹欠溝の形状とそれらの機能を示す部分破断斜視図である。

【図6】差圧調整ユニットの構成を示す説明図である。

【図7】差圧調整ユニットの動作を説明するための波形図である。

【図8】一実施例の細胞分画装置の外観図である。

【図9】一実施例の細胞分画装置の機能説明図である。

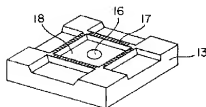
【図10】一実施例の細胞分画装置の機能を更に説明するための説明図である。

【図11】従来技術を説明するための説明図である。

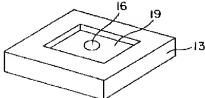
【符号の説明】

1…細胞分画ユニット、2…マイクロシリンジ、3…タンク、4…洗浄用タンク、5…負圧タンク、6、7、8、9…開閉弁、10…回収容器、11…下側平板部材、12…上側平板部材、13…フィルタ部材、14…側端部材、15…処理室、16…貫通孔、17…突条部、17b…凹欠溝、20…顕微鏡、21…ビデオカメラ、22…モニタ、23…中央制御ユニット、24…差圧調整ユニット、L₁、L₂、L₃…連結管。

【図3】



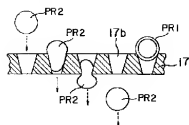
【図4】



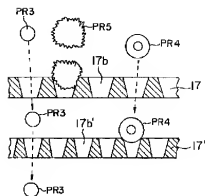
【図11】



【図9】



【図10】



フロントページの続き

(72)発明者 神谷 清

静岡県浜松市市野町1126番地の1 浜松ホ
トニクス株式会社内

(72)発明者 水口 義則

静岡県浜松市市野町1126番地の1 浜松ホ
トニクス株式会社内